

アッセイは生体サンプル中の複数のマーカーを高い分離性と選択性で定量分析が可能である。また、MRMアッセイは2D-LC-MALDI TOF MS/MSと比べて定量のスループットが格段に高く、大規模サンプルの定量分析に高い能力を持つ。

LC-MS/MS SRM (MRM)法について以下の研究開発項目について研究を実施する。

MRMアッセイの開発①～③を行い、④の臨床有効性研究によって、認知症バイオマーカーのMCI、早期ADの診断における臨床有効性を明らかにする。

① MRMトランジション作成。

② 認知症バイオマーカー候補ペプチドの（高感度）検出のための、血清サンプルの前処理方法の検討。

③ 検出限界と定量下限と再現性の検討。

④ 認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の評価。

図1 2にLC-MS/MS SRM (MRM)法の原理を示す。ペプチド（タンパク質）の定量は、プリースイオンではなく、フラグメントイオンで行う。

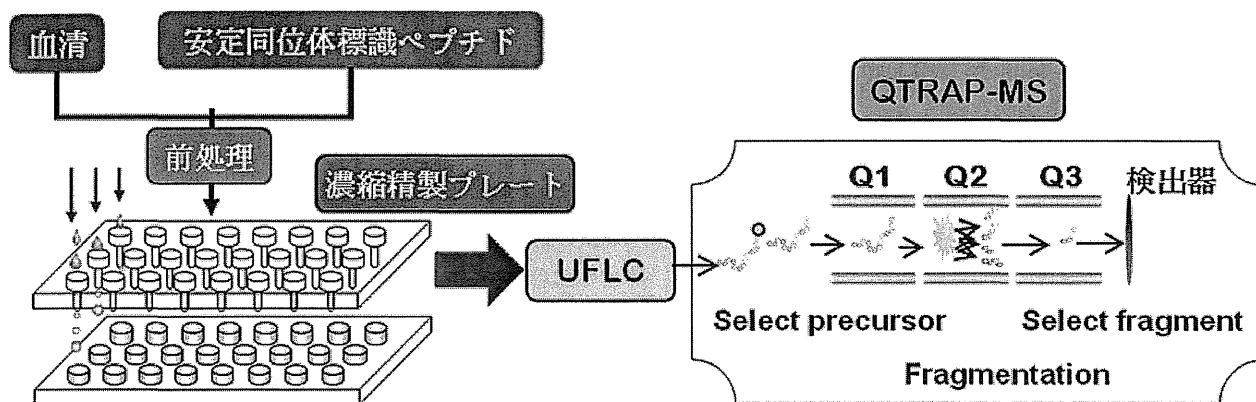


図1 2 LC-MS/MS SRM (MRM)法の原理

### C. 研究結果

本研究では、バイオマーカーペプチドの解析（計測）にはLC-MS/MS SRM (MRM) 法を用いることから、そのための血清前処理条件の検討、前処理方法について研究開発を行った。特にLCで分析するまでの簡便な前処理方法の確立は、次年度以降実施する臨床研究では必要であり、そのための条件検討を行い、最適化が終了した。

#### ① MRM トランジッション作成

図 1 3 にMRM トランジッションのパラメータを示す。これらの最適化の設定を13種類のバイオマーカーペプチドについて行なった。

Q1	<i>m/z</i> of precursor ion	Precursor ion (ペプチド)の <i>m/z</i>
Q3	<i>m/z</i> of fragment ion	Fragment ion (ペプチドを MS/MS したときに検出される特徴的なフラグメント)の <i>m/z</i>
CE	Collision Energy	ペプチドを開裂するときのエネルギー(V)
DP	Declustering Potential	ESI プローブからオリフィスプレートへの引き込み電圧 (V)
EP	Entrance Potential	オリフィスから Q0 ロッドへの引き込み電圧 (V)
CEP	Collision Cell Entrance Potential	Q1 ロッドからコリジョンセル(Q2)への引き込み電圧 (V)。この電圧状態で安定なイオン(Precursor ion)がコリジョンセルに導入される。
CXP	Collision Cell Exit Potential	コリジョンセル(Q2)の出口にかかる電圧 (V)。この電圧状態で安定なイオン(Fragment ion)が検出器へと通過する。

図 1 3 MRM トランジッションのパラメータ

MRM トランジッションはバイオマーカーペプチドをinfusion法でMS/MSを行い、Precursor ion (Q1)の*m/z*よりも大きくかつ強度が高いfragment ionをMRM測定用のion (Q3)として選択する。表 6 に13種のバイオマーカーペプチドのMRM トランジッションを示す。マーカー名に「Si」を付しているものはマーカーペプチドの安

定同位体ペプチドを示している。

表6 バイオマーカーペプチドのMRMトランジション

	Marker Name	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	AD1008	646.03	763.93	41	8	26	25	32
	AD1008Si	648.04	766.93	56	6.5	24	25	32
2	AD1025	538.93	968.45	46	5	28	23	38
	AD1025Si	540.93	968.45	41	9	50	23	58
3	AD1042	520.87	449.80	26	7	24	23	6
	AD1042Si	523.88	452.50	26	7.5	26	23	6
4	AD1046	856.92	720.27	51	9.5	40	37	30
	AD1046Si	859.93	726.28	51	10.5	36	39	32
5	AD1048	1163.52	1036.47	71	8.5	42	45	44
	AD1048Si	1166.52	1042.48	76	10.5	44	45	44
6	AD1049	512.28	629.37	31	8	18	23	8
	AD1049Si	514.62	636.39	41	6	18	21	28
7	ADPEP109315	776.88	796.38	51	8	36	33	36
	ADPEP109315Si	780.39	803.40	56	8.5	32	33	36
8	ADPEP421488	725.38	1046.53	36	8.5	30	29	42
	ADPEP421488Si	727.38	1052.54	36	7	26	27	44
9	ADPEP1315	744.37	1187.57	41	7	30	27	52
	ADPEP1315Si	747.37	1192.59	36	8	32	27	48
10	ADPEP12neu	942.02	1435.83	51	9	46	35	56
	ADPEP12neu-Si	945.02	1435.83	51	10	40	33	58
11	ADPEP1396	781.37	909.46	51	9.5	30	33	38
	ADPEP1396Si	784.38	915.47	51	9.5	32	33	40
12	ADPEP1039	638.80	1072.49	31	9	28	27	50
	ADPEP1039Si	642.30	1079.51	36	9	38	23	48
13	ADPEP1250	716.80	452.24	76	10	28	37	6
	ADPEP1250Si	720.30	452.24	86	6.5	28	37	6

②認知症バイオマーカー候補ペプチドの（高感度）検出のための、血清サンプルの前処理方法の検討。

MRM アッセイ開発において、血清サンプルの前処理は Oasis MAX  $\mu$ Elution plate を使用していた。MAX で前処理した後、MRM 分析を行ったところ、検出されなかった認知症マーカーが6種類あった。そこで Oasis HLB  $\mu$ Elution plate

を前処理に用いた。これは疎水性残基が担体に結合した固相プレートであり、単純にペプチドやその他の生体マトリックスの疎水性度の違いで分画する。

標準血清 25  $\mu$ l にペプチド合成した認知症マーカーをスパイクし、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate を用いて前処理を行い、MRM アッセイを行ったところ、すべてのペプチドの検出ができた (図 1 5)。AD1025、ADPEP109315、ADPEP1315 は他のマーカーと比べてエリア値が小さい。これは、ペプチドのアミノ酸残基の組成の違いにより、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate への相互作用が弱い／強いいため、ペプチドが素通り／吸着したと考えられる。これらのペプチドについては、Oasis HLB  $\mu$ Elution plate の前処理に用いる洗浄溶媒、溶出溶媒について個別に検討する必要がある。

表7 Oasis HLB  $\mu$ Elution での前処理

	Analyte	Average Area (counts)
1	AD1008	7210
2	AD1025	10.55
3	AD1042	418
4	AD1046	1120
5	AD1048	790.5
6	AD1049	368.5
7	ADPEP109315	40.65
8	ADPEP421488	1063
9	ADPEP1315	16.86
10	ADPEP12neu	1054
11	ADPEP1396	1765
12	ADPEP1039	737.5
13	ADPEP1250	665

### ③検出限界と定量下限と再現性の検討

各バイオマーカーペプチドを標準血清にスパイクし、外部標準法でMRMアッセイを行った。本年度は、一部のバイオマーカーペプチドについて終了した。

外部標準法で定量する際のサンプルの調製法の概略は図14（左図）のとおりである。6種類のバイオマーカーペプチドを終濃度40 fmol/ $\mu$ lになるようにスパイクし、これを標準血清で段階希釈して、終濃度0.02 fmol/ $\mu$ lから40 fmol/ $\mu$ lの標準血清を作成した。これらに終濃度が4 fmol/ $\mu$ lになるように安定同位体バイオマーカーペプチドを内部標準として加えた。これを用いてLC-MS/MSアッセイを行い、検出したア

ナライトと内部標準の比をとり、検量線を作成する。各希釈系列サンプルは(n=3)とした。

図16右図に6種のバイオマーカーの一つであるADPEP1039の検量線を示す。縦軸はLC-MS/MS測定で検出したアナライト(バイオマーカーペプチド)と内部標準(IS)の面積値の比であり、横軸は標準血清にスパイクしたアナライトの量を示している。

$R^2=0.98966$ と高い精度で検量線が作成できた。

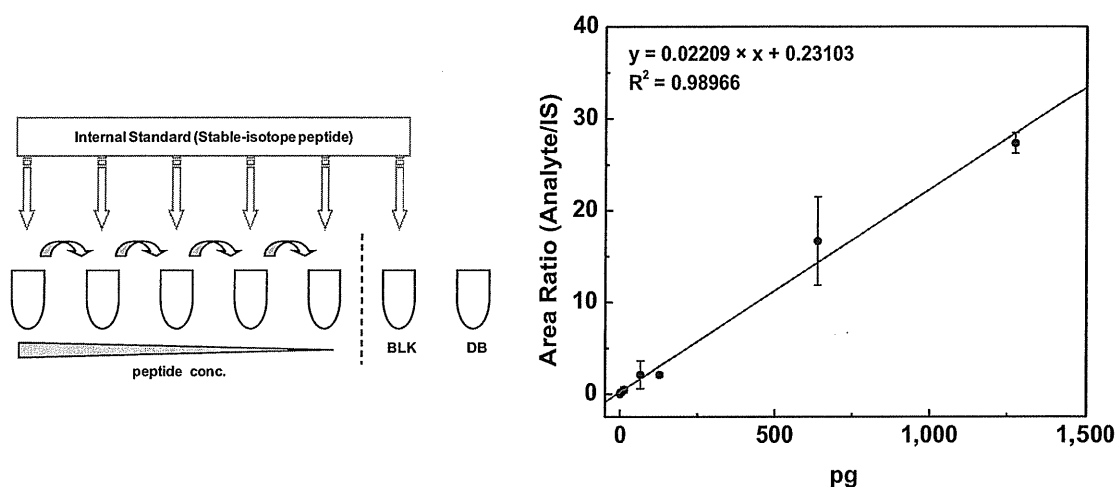


図14 外部標準法で用いる標準サンプルの調製 (左図)、ADPEP1039の検量線 (右図)

(左図) Double Blank (DB)は標準血清のみ、Blank (BLK)は標準血清に内部標準(安定同位体ペプチド)を加えた血清

表に各バイオマーカーペプチドの検出限界と定量下限値と検出範囲を示す。いずれのバイオマーカーペプチドについて、検出限界、定量下限値は約30 pg/mlオーダーで検出可能であった。またダイナミックレンジは30 pg/mlから100 ng/mlの範囲で定量可能であることが分かった。

表 8 6種のバイオマーカーの検出限界と定量下限値

	検出限界 (pg/ml)	定量下限値 (pg/ml)	Dynamic range (ng/ml)
AD1046	34.24	34.24	0.035 - 68.52
AD1048	46.52	46.52	0.047 - 93.06
AD1049	30.68	30.68	0.031 - 61.40
ADPEP1396	31.24	31.24	0.032 - 62.47
ADPEP1039	25.52	25.52	0.026 - 51.06
ADPEP1250	28.64	28.64	0.029 - 57.30

MRMアッセイを用いた認知症マーカーペプチド検出の再現性は合成したバイオマーカーペプチドの溶液を用いて行った。6種の認知症マーカーペプチドの混合溶液(1 pmol each)を40回繰り返し測定した。1回あたりのMRMアッセイは20分で測定した。表8に認知症マーカーペプチドの溶出時間(Retention time)および、面積値(Area)の平均値(Ave.)と標準偏差(SD)、および変動値(CV, %)を示した。溶出時間については、いずれのバイオマーカーペプチドについてもCVが2%以下であり、UFLCの送液の安定性が高いことを示している。面積値については、AD1046, AD1049, ADPEP1396, ADPEP1039がCV15%以下であり高い再現性を示した。残りの2ペプチドについては、CVが20%以上であった。AD1048、ADPEP1250は面積値が再現性の高い4ペプチドと比較すると値の桁が一桁異なっている。すなわち、変動値が高いバイオマーカーペプチドは検出感が悪い。これらのペプチド(AD1048, ADPEP1250)についてはMRMトランジションの再構築を行う予定である。

表9 6種のバイオマーカーの再現性 (溶出時間、面積値)

	Retention time (min)			Area (counts)		
	Ave.	SD	CV (%)	Ave.	SD	CV (%)
AD1046	5.98	0.08	1.39	3481.05	406.41	11.67
AD1048	8.24	0.10	1.23	241.09	83.68	34.71
AD1049	6.08	0.06	0.98	7228.30	821.80	11.37
ADPEP1396	7.16	0.10	1.41	3578.05	398.30	11.13
ADPEP1039	5.19	0.07	1.27	6665.71	588.95	8.84
ADPEP1250	4.96	0.06	1.20	767.42	154.94	20.19

④ 認知症バイオマーカー候補の臨床有効性の評価—利根町縦断研究サンプルを用いて

知的健常 (NDC: Before onset) からMCI (After onset)、アルツハイマー病へと至った縦断研究症例におけるマーカーの推移を示す。補体タンパク質由来のペプチド (図19上段) ならびに血液凝固系タンパク質由来ペプチドの変化 (図15下段)。横軸はサンプルの種類 (MCI発症前後)、縦軸は血清中の濃度を示す。発症前が2005年、発症後が2008年である。

補体タンパク質由来ペプチドAD1008はMCIの発症とともに有意に上昇していた。血液凝固系タンパク質由来ペプチドADPEP1039はMCIの発症とともに減少の傾向を示していた。同じく血液凝固系タンパク質由来ペプチドであるADPEP1250はMCIの発症とともに有意に上昇していた。



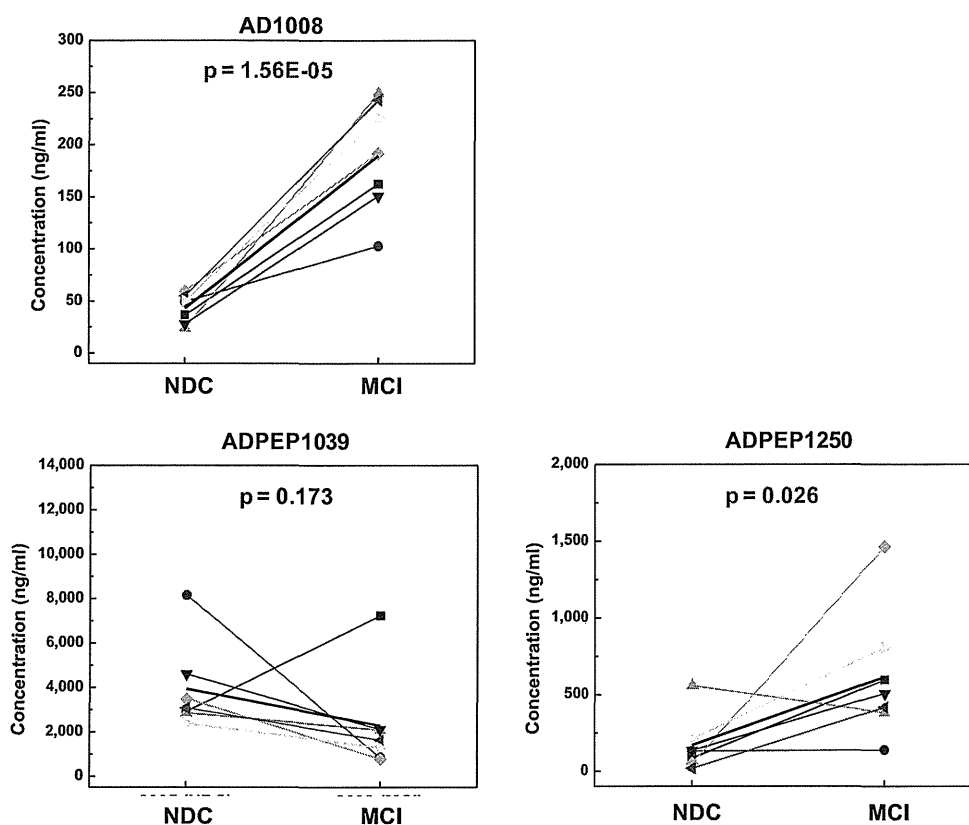


図15 「利根町縦断研究サンプルを用いた定量  
上段：補体タンパク質由来ペプチド (AD1008), 下段：血液凝固系タン  
パク質由来ペプチド ADPEP1039 (下段左), ADPEP1250 (下段右)

#### D. 考察

MRMトランジション作成について、13種の認知症マーカーペプチドおよび、その安定同位体ペプチドのMRMトランジションの構築を行った。

前処理については、Oasis HLB  $\mu$ Elution plateを用いることにより、13種すべてのペプチドの検出ができたものの、AD1025、ADPEP109315、ADPEP1315は前処理後のMRMアッセイで他のペプチドと比較して強度が低かった。これはペプチドのアミノ酸残基の組成の違いにより、Oasis HLB  $\mu$ Elution plateへの相互作用が弱い/強いため、ペプチドが素通り/吸着したと考えられた。これらのペプチドにつ

いては、Oasis HLB  $\mu$ Elution plateの前処理に用いる洗浄溶媒、溶出溶媒について個別に検討し、最適条件を得た。

利根町縦断研究サンプルを用いた補体タンパク質由来ペプチドの定量においては、バイオマーカーペプチドで有意差があった。さらには血液凝固系タンパク質由来ペプチドについても、有意な変化が見られた。

## E. 結論

1. ペプチドミクス解析で見いだされた MCI や AD に移行するタイミングで変動するバイオマーカーペプチドについて、非標識 LC-MS (MALDI) 法ならびに iTRAQ 標識 LC-MS (MALDI, ESI) 法の異なる定量方法でその再現性を確認した。
2. そのうち、prothrombin, neurexin, protocadherin などシナプス障害に関わる因子と complement など炎症 (Ab オリゴマー排除) に関わる因子について、多施設血清サンプルを用いた横断研究の結果と時経列縦断研究の結果が一致した。
3. Focused proteomics 解析により、認知症発症リスク要因とリスク抵抗要因に関わる生体分子として、3つのタンパク質を同定した。これらのタンパク質は健常の老化においてもその量が低下するものもあるが、知的健常から MCI、AD へと至った者で顕著に低下した。
4. これらの3つのタンパク質の組み合わせで多重ロジスティクス回帰解析による判別分析 (以下本検査) で、AD vs. 知的健常において感度 92%, 特異度 70% を、MCI vs. 知的健常において感度 90%, 特異度 50%を得た。これに MMSE を加えるとそれぞれ特異度が 96%, 85%となった。

5. 無作為に選んだ対象者で本検査を実施、その後確定診断を行った前向き研究で判定した結果、感度と特異度とも約 70%であった。MMSE を加えるとほぼ 95%以上の精度で判定でき、MMSE24-30 点の対象者から MCI を見いだすことができ、MCI のスクリーニング検査としての有効性が示された。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内田和彦 目野浩二 鈴木秀昭 赤津博康 水上勝義 朝田隆	認知機能障害とアルツハイマー病の血液バイオマーカー.	Dementia Japan	27	277-288	2013
Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, Uchida K.	Serum protein isoform profiles indicate the progression of hepatitis C virus-induced liver diseases.	Int. J. Mo.l Med.	31	943-950	2013
Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H.	Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts.	Int. J. Oncol.	42	543-548	2013

Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, <u>Uchida K</u> , Kato M, Miyata T, Takahashi S.	Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice.	J. Biochem	152	549-555	2012
Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, <u>Uchida K</u> , Takahashi S, Ema M.	Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo.	Blood	120	914-923	2012

<p>Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Tran MT, Kudo T, <u>Uchida K</u>, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S.</p>	<p>c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver.</p>	<p>Blood</p>	<p>118</p>	<p>1374-85</p>	<p>2011</p>
<p>Endo G, Tachikawa H, Fukuoka Y, Aiba M, Nemoto K, Shiratori Y, Matsui Y, Doi M, <u>Asada T</u>.</p>	<p>How perceived social support relates to suicidal ideation: A Japanese social resident survey..</p>	<p>Int. J. Soc. Psychiatry</p>		<p>Epub ahead of print</p>	<p>2013</p>

<p>Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, <u>Asada T</u>, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.</p>	<p>Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A<math>\beta</math> and differential drug responsiveness.</p>	<p>Cell Stem Cell</p>	<p>12</p>	<p>487-496</p>	<p>2013</p>
--	--	-----------------------	-----------	----------------	-------------



Nose M, Kodama C, Ikejima C, Mizukami K, Matsuzaki A, Tanaka S, Yoshimura A, Yasuno F, <u>Asada T.</u>	ApoE4 is not associated with depression when mild cognitive impairment is considered.	Int J Geriatr Psychiatry.	28	155-163	2013
Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, <u>Asada T.</u>	Combination of antioxidant supplements improved cognitive function in the elderly.	J. Alzheimers Dis.	32	895-903	2012
Ikejima C, Hisanaga A, Meguro K, Yamada T, Ouma S, Kawamuro Y, Hyouki K, Nakashima K, Wada K, Yamada S, Watanabe I, Kakuma T, Aoyama Y, Mizukami K, <u>Asada T.</u>	Multicentre population-based dementia prevalence survey in Japan: a preliminary report.	Psychogeriatrics.	12	120-123	2012

Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Hidaka S, <u>Mizukami K</u> , Asada T.	Effect of plasma lipids, hypertension and APOE genotype on cognitive decline.	Neurobiol Aging	33	2633-2640	2012
Hidaka S, Ikejima C, Kodama C, Nose M, Yamashita F, Sasaki M, Kinoshita T, Tanimukai S, <u>Mizukami K</u> , Takahashi H, Kakuma T, Tanaka S, <u>Asada T</u> .	Prevalence of depression and depressive symptoms among older Japanese people: comorbidity of mild cognitive impairment and depression.	Int J Geriatr Psychiatr y	27	271-279	2012
Mizukami K, Abrahamson EE, Mi Z, Ishikawa M, Watanabe K, Kinoshita S, Asada T, Ikonovic MD	Immunohistochemical analysis of ubiquilin-1 in the human hippocampus: association with neurofibrillary tangle pathology.	Neuropat hology	34	11-8	2014  Epub 2013 Jul 21.

Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Hidaka S, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, Michikawa M, Asada T.	Association between Cognitive Function and Plasma Lipids of the Elderly After Controlling for Apolipoprotein E Genotype.	Am J Geriatr Psychiatr y	40	2709-14	2011
Ota M, Nemoto K, Sato N, Mizukami K, Yamashita F, Asada T.	Relationship between white matter T2 hyperintensity and cortical volume changes on magnetic resonance imaging in healthy elders.	Int J Geriatr Psychiatr y.	26	886	2011
Mizukami K, Ishikawa M, Akatsu H, Abrahamson EE, Ikonomic MD, Asada T.	An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the hippocampus of subjects with Alzheimer's disease.	Neuropat hology	31	503	2011

## 軽度認知障害とアルツハイマー病の 血液バイオ-マーカー

内田 和彦<sup>1)</sup>, 目野 浩二<sup>2)</sup>, 鈴木 秀昭<sup>2)</sup>  
赤津 弘康<sup>3)</sup>, 水上 勝義<sup>4)</sup>, 朝田 隆<sup>5)</sup>

### 1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) などの認知症は, 近年急激に増加しており, 認知症の早期診断と早期介入が高齢化社会における重要な課題となっている. 軽度認知障害 (MCI) は, 認知症の前駆状態で放置し

ておくと5~7年後にその50-70%がADなどの認知症を発症する. 最近の厚労省の調査により, 我が国の認知症有病率は15%と推定され, 認知症有病者数は462万人, MCIの全国有病率推定値は13%, MCI有病者数は400万人とこれまでの推定患者数を上回ることが明らかになった(朝田隆, 2013). MCIの段階で治療・介入すれば, 認知機能の改善と認知症の予防ができることが期待されるが, その診断には詳細な問診・心理テスト, さらには脳画像検査を要する. ADの早期診断も同様である. ADでは脳脊髄液 (CSF) 中のリン酸化タウタンパク質, アミロイドβペプチド (Aβ) が診断マーカーとして有用である (Blennow & Hampel, 2003). しかしCSFは採取が侵襲的であり, また簡単な問診・テストといえどもそのために人手と時間を要し, すぐに日常の臨床現場や検診でその利用を広めることは難しい. 脳画像解析からMCIを見いだすためには, Magnetic Resonance Imaging (MRI) や Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) が少なくとも必要であり, さらに Positron Emission Tomography (PET) を実施するためにはそのための施設が必要である. 早期のADやMCIをスクリーニングするためには, すでに検診・臨床検査で利用されている血液検査の導入が望ましい. しかし, 認知機能の低下を検知できる血液検査は難しいとされてき

Peripheral biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease

Kazuhiko Uchida<sup>1)</sup>, Kohji Meno<sup>2)</sup>, Hideaki Suzuki<sup>2)</sup>, Hiroyasu Akazu<sup>3)</sup>, Katsuyoshi Mizukami<sup>4)</sup>, Takashi Asada<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 筑波大学医学医療系 分子生物腫瘍 [〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1]

Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba (1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

<sup>2)</sup> 株式会社MCBI 研究開発部 [〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学産学リエゾン共同研究センター]

Research Division, MCBI, Inc. (Tsukuba Industrial Liaison and Cooperative Research Center, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan)

<sup>3)</sup> 医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所 [〒441-8124 愛知県豊橋市野依町字山中 19-14]

Choju Medical Institute, Fukushima Hospital (Noi, Toyohashi, Aichi 441-8124, Japan)

<sup>4)</sup> 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 スポーツ健康システム・マネジメント科学専攻 [〒112-0012 東京都文京区大塚 3-29-1]

Sports and Health Promotion, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba (3-29-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0012, Japan)

<sup>5)</sup> 筑波大学医学医療系 精神医学 [〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1]

Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Tsukuba (1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)